

88-240645

83

Octrooiraad



⑫A Terinzagelegging ⑪ 8700089

Nederland

⑬ NL

YACE 203/204

⑭ Therapeutische toepassing van dideoxythymidine en dideoxythymidineen.

⑮ Int.Cl.: A61K31/70, C07D 405/04.

⑯ Aanvrager: Stichting Rega V.Z.W. te Leuven, België.

⑰ Gem.: Ir. R. Hoijtink c.s.  
Octrooibureau Arnold & Siedsma  
Sweelinckplein 1  
2517 GK 's-Gravenhage.

MEDICAMENTS FOR TREATING AIDS + CONTG.  
2',3'-DI-DEOXY-THYMIDINE OR 2',3'-DI-DEOXY-  
THYMIDINENE

⑱ Aanvraag Nr. 8700089.

⑲ Ingediend 15 januari 1987.

⑳ ..

㉑ ..

㉒ ..

㉓ ..

㉔ Ter inzage gelegd 1 augustus 1988.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

1485

88240645

Therapeutische toepassing van dideoxythymidine en dideoxythymidineen.

De uitvinding betreft een nieuw therapeutisch middel voor het behandelen van AIDS en verwante ziekten, en ook op de bereiding en toepassing daarvan.

AIDS of verworven immunodeficientiesyndroom is een pandemische ziekte gekenmerkt door een grote gevoeligheid voor ongebruikelijke maligniteiten en verzwakking van het immuunsysteem, gepaard gaande met levensgevaarlijke infecties. De veroorzaker van AIDS is geïdentificeerd als een retrovirus, genaamd HTLV-III/LAV oftewel "human T-cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus". In de huidige beschrijving zal dit retrovirus HIV of humaan immunodeficientievirus worden genoemd, zoals voorgesteld in Science, 232, 1486 (1986). Onlangs zijn ook enkele andere virussen beschreven, die verwant zijn aan HIV en die aan AIDS verwante ziekten of ziekte toestanden veroorzaken.

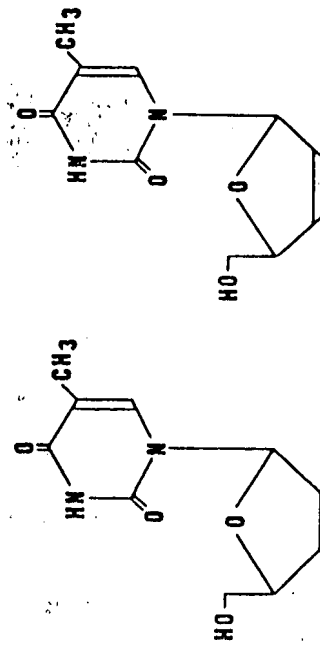
Het is reeds bekend dat 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (azidothymidine, AZT, Njddthd) één krachtige inhibitor van de HIV-replicatie in lymfocyt-culturen is en dat het de cellen tegen het cytopathogene effect van dat virus zal beschermen bij een concentratie van 5-10  $\mu$ M (Mitsuya et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 82, 7096-7100 (1985)). Verder is het bekend dat 2',3'-dideoxyribosyl-derivaten van purinen (adenine, guanine, hypoxanthine) en pyrimidinen (thymine en cytosine) de door HIV opgewekte cytopathogeniteit in vitro significant onderdrukken. Het meest krachtige derivaat van deze reeks is 2',3'-dideoxycytidine dat reeds een volledige antivirale bescherming zal leveren bij een lage concentratie van 0,5-1,0  $\mu$ M (Mitsuya et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 83, 1911-1915 (1986)). Bovendien is onlangs gevonden dat een onverzadigd derivaat van 2',3'-dideoxycytidine, namelijk 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxycytidine of 2',3'-dideoxycytidineen, evenals 2',3'-dideoxycytidine zelf een krachtige en selectieve inhibitor van HIV in vitro is (Balzarini et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 140, 735-742, (1986)).

20  
25  
30  
35

Naast deze bekende materie bestaat behoefte aan andere stoffen die als potentiële HIV-inhibitoren werken. De uitvinding heeft dan ook als primair oogmerk zulke inhibitoren te leveren, evenals therapeutische preparaten die deze 5 inhibitoren bevatten.

In overeenstemming met de uitvinding is nu gevonden, dat 2',3'-dideoxythymidine en een onverzadigd derivaat daarvan namelijk 2',3'-dideoxythymidineen, eveneens krachtige en selectieve anti-HIV-middelen zijn. Hun selectiviteit en 10 potentie is vergelijkbaar met die van 2',3'-dideoxycytidine en daardoor kunnen zij met voordeel worden gebruikt in farmaceutische preparaten die bestemd zijn voor het behandelen van AIDS-patiënten. Een potentiële gebruik tegen ziekten, veroorzaakt door aan HIV verwante virussen valt eveneens binnen het 15 kader van de uitvinding.

2',3'-dideoxythymidine (ddThd) en 2',3'-dideoxythymidineen (ddeThd) kunnen worden weergegeven door de volgende chemische formules I en II:



ddThd

ddeThd

I

II

8700089

88240645

1486

88240645

1487

Beide stoffen werden reeds in de jaren 1960 door Horwitz et al. gesynthetiseerd (vergl. J. Org. Chem., 32, 817-818 (1967) en Tetrahedron Letters, 1964, 2725-2727 en 1966, 1343-1346). Daarom vormen de verbindingen als zodanig 5 en hun chemische synthese geen deel van de huidige uitvinding.

In hun werking als anti-HIV middelen vertonen 2',3'-dideoxythymidine en 2',3'-dideoxythymidineen een selectiviteit en een potentie die vergelijkbaar zijn met die van 10 2',3'-dideoxycytidine. Beide stoffen zijn echter minder krachtige HIV-inhibitoren dan azidothymidine. Bij onderlinge vergelijking blijkt 2',3'-dideoxythymidineen een krachtiger werking en 2',3'-dideoxythymidine een meer selectieve werking te hebben. De selectieve werking van 2',3'-dideoxythymidine 15 is zelfs vrijwel gelijk aan die van azidothymidine.

Het onverzadigde derivaat, 2',3'-dideoxythymidineen is giftiger voor niet-geïnfecteerde gastheercellen dan het verzadigde derivaat 2',3'-dideoxythymidine. Niettemin bleek 20 bijparallele proeven dat de selectiviteitsindex van 2',3'-dideoxythymidineen slechts weinig minder was dan die van 2',3'-dideoxycytidine.

Opgemerkt wordt dat de anti-HIV werking van 2',3'-dideoxythymidine reeds eerder is getest zonder dat daaruit 25 een krachtige werking bleek (vergl. Mitsuya et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 83, 1911-1915 (1986)). Volgens deze

publicatie werd de cytopathogene werking van HIV in ATH8-cellen volledig door 2',3'-dideoxycytidine en 2',3'-dideoxythymidine geremd bij een concentratie van respectievelijk 0,5µM en 200µM. Daarentegen bleek bij proeven die tot de 30 huidige uitvinding leidden, dat dezelfde stoffen in MT-4 cellen een volledige bescherming tegen HIV leveren bij een concentratie van respectievelijk 0,2µM en 1µM. In tegenstelling tot de genoemde literatuur blijkt 2',3'-dideoxythymidine derhalve wel goede vooruitzichten als anti-HIV-middel te bieden.

Therapeutische preparaten die 2',3'-dideoxythymidine of 2',3'-dideoxythymidineen als werkzaam bestand-

1488

88240645

1489

88240645

deel voor het behandelen van AIDS in de humane praktijk bevatten, kunnen de vorm hebben van poeders, suspensies, oplos- singen, sprays, emulsies, zalven of crèmes en kunnen worden gebruikt voor lokale toediening, voor intranasale, rectale, 5 vaginale en ook voor orale of parenterale (intraveneuse, intradermale, intramusculaire, intrathecale etc.) toediening. Dergelijke preparaten kunnen worden bereid door de actieve stof van formule (I) of (II) te combineren (bijvoorbeeld door mengen, oplossen etc.) met farmaceutisch aanvaard- 10 bare excipiëntia van neutrale aard (zoals waterige of niet-waterige oplosmiddelen, stabilisatoren, emulgatoren, detergentia, additieven), en verder desgewenst met kleur- en geurstoffen. De concentratie van het actieve bestanddeel in het therapeutische preparaat kan sterk variëren tussen 0,1% en 15 100%, afhankelijk van de wijze van toediening. Verder kan de dosis van het toe te dienen actieve bestanddeel variëren tussen 0,1 mg en 100 mg per kg lichaamsgewicht.

De anti-HIV-eigenschappen van 2',3'-dideoxythymidine en 2',3'-dideoxythymidineen worden gedocumenteerd door de volgende voorbeelden die niet in beperkende zin 20 dienen te worden gelezen. Diverse andere 2',3'-dideoxynucleosiden en hun 2',3'-onverzadigde derivaten worden daarin voor vergelijkingsdoeleinden gebruikt.

In de voorbeelden wordt herhaaldelijk verwezen naar de 25 de bijgaande tekeningen, waarin:

fig. 1 een grafische voorstelling is van de testresultaten over de remming van het cytopathogene effect van HIV in MT-4 cellen door diverse 2',3'-dideoxynucleosiden en hun 2',3'-onverzadigde derivaten,

30 fig. 2 een grafische voorstelling is van de testresultaten over de remming van de virusantigeen-expressie in door HIV geïnfecteerde MT-4 cellen door dezelfde reeks 2',3'-dideoxynucleosiden en hun 2',3'-onverzadigde derivaten.

In de voorbeelden en de tekeningen worden de volgende 35 gende afkortingen gebruikt:

HIV - humaan immunodeficiëntie virus, zoals oorspronkelijk afgeleid uit een "pool" van AIDS-patiënten.

ddAdo - 2',3'-dideoxyadenosine;

ddThd - 2',3'-dideoxythymidine;

ddCyd - 2',3'-dideoxycytidine;

ddUrd - 2',3'-dideoxyuridine;

ddeAdo - 2',3'-dideoxyadenosine;

ddeThd - 2',3'-dideoxythymidine;

ddeCyd - 2',3'-dideoxycytidine;

ddeUrd - 2',3'-dideoxyuridine;

MT-4 cellen - cellen van een humane T4-lymfocyten cellijn die HTLV-I draagt (vergl. Harada et al, Science, 229, 563-566 (1985));

HTLV-I - Type 1 van het humane T-cel lymfotroop virus; RPMI-140 - een kweekmedium voor celculturen ontwikkeld in het Roswell Park Memorial Institution en geleverd door Gibco, Grand Island, N.Y., U.S.A.

Het bevat anorganische zouten (NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, etc.), glucose, diverse aminozuren en diverse vitaminen;

CCID50 - de virusdosis voldoende om 50% van de celcultuur te infecteren.

Wat de chemische verbindingen betreft, werden ddCyd en ddUrd verkregen van Pharmacia, en werden ddAdo en ddThd verkregen van Calbiochem-Behring. De onverzadigde derivaten werden gesynthetiseerd door een 2'-deoxy-3',5'-epoxy-nucleoside te laten reageren met kalium t-butanolaat in dimethylsulfoxide volgens de methode van Horwitz et al. (J. Org. Chem., 32, 817-818 (1967)). De spectraaldata waren consistent met die welke eerder werden gepubliceerd.

Het HIV werd verkregen van het National Cancer Institute, Bethesda, Md, U.S.A., waar het werd geoogst uit de cultuurvloei-stof van HIV-producerende H9 cellen, zoals beschreven door Popovic et al. in Science 224, 497-500 (1984).

Dit virus werd bewaard bij -70°C, totdat het gebruikt werd. De titer van het virus, uitgedrukt in CCID50, was vooraf bepaald.

88240645

149100089

De MT-4 cellen waren verkregen bij het Instituut Pasteur te Parijs, Frankrijk.

Voorbeeld 1

Remming van het cytopathogene effect van HIV.

5 Een viertal 2',3'-dideoxynucleosiden en hun 2',3'-onverzadigde derivaten werden met elkaar vergeleken aangaande hun remmende werking op het cytopathogene effect van HIV in MT-4 cellen. De methode is beschreven door Mitsuya et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 7076-7100 (1985).

10 De MT-4 cellen werden ingesteld op een concentratie van 5 x 10<sup>5</sup> cellen/ml. met behulp van RPMI-1640 medium, gesuplementeerd met 10% foetaal kalverserum en antibiotica, waarna porties van 2 ml. van de celsuspensie werden geïnfecteerd met 200µl van de virusvloei-stof (titer: 103,8 CCID50/ml, eindtiter: 300 CCID50/holte). Voor de controleproeven werden MT-4 cellen quasi-geïnfecteerd met 200µl celkweekmedium. De cellen werden bij 37°C geïncubeerd. Na 90 minuten

incubatie werd 1,8 ml kweekmedium aan elke portie van de celsuspensie toegevoegd. In de holtes van een microtiterplaat van kunststof werden vooraf diverse verdunningen (telkens 100µl) van de te beproeven verbindingen in celkweekmedium bereid.

20 Daarna werd 100µl van de met HIV geïnfecteerde of de quasi-geïnfecteerde celsuspensie aan elke holte toegevoegd en werden de celculturen bij 37°C geïncubeerd. Na 5 dagen werd 25 de levensvatbaarheid van de cellen microscopisch vastgesteld in een hematocytometer met behulp van de trypanblauw-exclusiemethode.

De resultaten van de proef met MT-4 cellen zijn weergegeven in fig. 1 van de tekening, waarin het aantal levensvatbare cellen na 5 dagen is uitgezet tegen de concentratie van de te beproeven verbindingen. De zwarte kolommen hebben betrekking op proeven met door HIV geïnfecteerde cellen, terwijl de witte kolommen betrekking hebben op proeven met quasi-geïnfecteerde cellen.

35 Uit fig. 1 blijkt dat ddThd het meest krachtig was bij het beschermen van de cellen tegen vernietiging door het

88240645

virus. Bij 0,04  $\mu$ M beschermde ddeThd de MT-4 cellen volledig, terwijl de op één na krachtigste verbinding, ddCyd een concentratie van 0,2  $\mu$ M nodig had om een volledige bescherming bij te geven. De stof ddeThd leverde circa 45% bescherming bij 0,008  $\mu$ M, bij welke concentratie ddCyd totaal geen remmende werking had.

Met ddeThd werd een volledige bescherming tegen de cytopathogene werking van HIV bereikt bij een concentratie van 1  $\mu$ M. De stof ddeCyd beschermde de cellen eveneens tegen HIV bij een concentratie van 1  $\mu$ M. De andere verbindingen waren minder krachtig in hun anti-HIV werking, aangezien ddAdo een volledige bescherming pas leverde bij 25  $\mu$ M, en ddUrd een bescherming van 80% leverde bij 125 en 250  $\mu$ M, terwijl ddeAdo en ddeUrd praktisch geen beschermende werking vertoonden.

Uit fig. 1 (de witte kolommen) blijkt verder dat de testverbindingen bij hogere concentratie cytotoxisch gaan werken en dat de verbindingen in dit opzicht grote verschillen vertonen. Zo remde ddeThd het aantal levensvatbare cellen met 245% bij een concentratie van 1  $\mu$ M, terwijl ddCyd het aantal levensvatbare cellen met 25% vermindert bij een concentratie van 5  $\mu$ M.

De waarden van ED50 (de 50% antiviraal werkzame dosi's) en van TD50 (de 50% cytotoxische dosi's) voor de testverbindingen zijn weergegeven in Tabel 1. Tevens vindt men daarin de waarden van de selectiviteitsindex (SI), dat wil zeggen de verhouding van TD50 tot ED50, weergegeven.

Tabel 1

Verbinding	ED50 ( $\mu$ M)	TD50 ( $\mu$ M)	SI
ddAdo	2,5	>250	>100
ddeAdo	>125	9,5	<0,08
ddThd	0,20	>125	>625
ddeThd	0,010	1,2	120
ddCyd	0,046	9,1	198
ddeCyd	0,13	7,9	61
ddUrd	48	>250	>5,2
ddeUrd	>125	27	<0,22

88240645

1492

Uit Tabel 1 blijkt dat ddeThd de hoogste selectiviteitsindex vertoonde. Deze verbinding was niet giftig bij concentraties van maximaal 125  $\mu$ M. Daarop volgden de stoffen ddeThd, ddCyd en ddeCyd, die echter betrekkelijk giftig waren, alsmede ddAdo en ddUrd, waar de ED50 betrekkelijk laag was. De resterende stoffen ddeAdo en ddeUrd hadden een negatieve waarde voor de selectiviteitsindex.

Voorbeeld 2

Remming van de virusantigeen-expressie.

Dezelfde verbindingen als in Voorbeeld 1 werden ook met elkaar vergeleken, wat betreft hun remmende werking op de expressie van virusantigenen in met HIV geïnfecteerde MT-4 cellen. Dit effect werd bepaald door indirecte immunofluorescentie en laserstroom cytofluorografie, waarbij polyklonale antilichamen van een AIDS-patiënt als sonde werden gebruikt. De resultaten zijn weergegeven in fig. 2 van de tekening, waarin het percentage fluorescente cellen (dat wil zeggen het percentage antigeen-positieve cellen) is uitgeret tegen de concentratie van de testverbindingen. De gebruikte symbolen hebben de volgende betekenis:

- ddAdo
- ★ ddeThd
- ddCyd
- ▲ ddUrd
- ddeAdo
- ☆ ddeThd
- ddeCyd
- △ ddeUrd

Het gemiddelde percentage aan fluorescente cellen in afwezigheid van enige testverbinding (positieve controle) was 60  $\pm$  5%, terwijl het gemiddelde percentage fluorescente cellen in de quasi-geïnfecteerde cellen (negatieve controle) 1,0% was.

Uit fig. 2 blijkt dat de stof ddeThd een volledige remming van de virusantigeen-expressie veroorzaakte bij een concentratie van 0,04  $\mu$ M. Deze concentratie was gelijk aan die welke benodigd was voor volledige bescherming tegen de cytopathogene werking van HIV. Op dezelfde wijze onderdrukte ddCyd de expressie van het virusantigeen volledig bij 0,2  $\mu$ M,

88240645

1493

bij welke concentratie het ook een volledige bescherming tegen de cytopathogene werking van het virus leverde. Als regel bestond een duidelijke correlatie tussen de remmende werking van de verbindingen op de HIV-antigeenproductie en de remmende werking op het cytopathogene effect van HIV.

\*\*\*\*\*

5

CONCLUSIES

1. Therapeutisch middel ten gebruike bij de behandeling van AIDS en verwante ziektes, welk middel 2',3'-dideoxythymidine of 2',3'-dideoxythymidineen als werkzaam bestanddeel bevat.
2. Werkwijze voor het behandelen van AIDS en verwante ziekten, gekenmerkt doordat men 2',3'-dideoxythymidine of 2',3'-dideoxythymidineen toedient aan een patiënt die aan AIDS of een verwante ziekte lijdt.
3. Toepassing van 2',3'-dideoxythymidine of 2',3'-dideoxythymidineen voor het bereiden van een therapeutisch middel met werking tegen AIDS en verwante ziekten.

\*\*\*\*\*

10

88240645

1484

8700089

1485

88240645

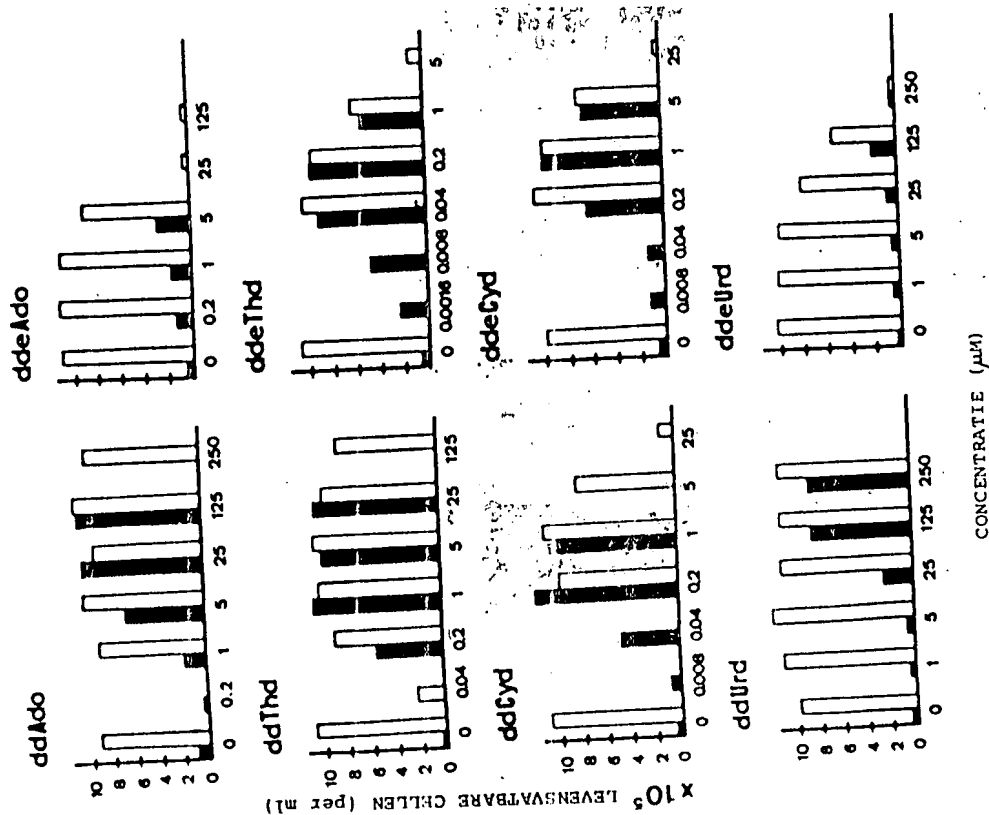


Fig. 1

88240645

1498

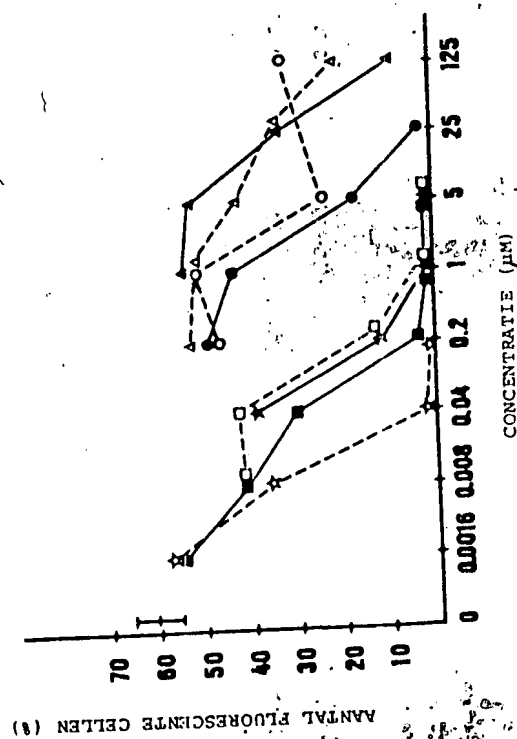


Fig. 2

88240645

1497